

日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

21.02.00

4

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

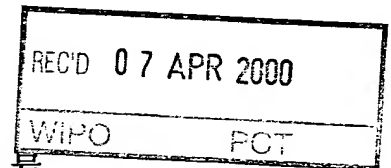
1999年 2月22日

出 願 番 号  
Application Number:

平成11年特許願第042926号

出 願 人  
Applicant(s):

株式会社京都第一科学

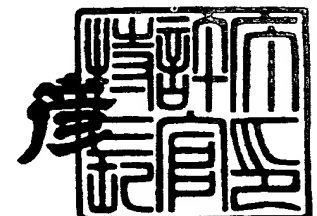


PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 3月24日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3019028

【書類名】 特許願

【整理番号】 R2831

【提出日】 平成11年 2月22日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 9/48

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地 株式会社京都第一科学内

【氏名】 石丸 香

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地 株式会社京都第一科学内

【氏名】 八木 雅之

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地 株式会社京都第一科学内

【氏名】 米原 聡

【特許出願人】

【識別番号】 000141897

【氏名又は名称】 株式会社京都第一科学

【代理人】

【識別番号】 100095555

【弁理士】

【氏名又は名称】 池内 寛幸

【電話番号】 06-6361-9334

【選任した代理人】

【識別番号】 100076576

【弁理士】

【氏名又は名称】 佐藤 公博

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012162

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9601589

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規酵素

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 糖化タンパク質または糖化ペプチドから、 $\alpha$ -アミノ基が糖化されたアミノ酸残基を遊離させる新規酵素。

【請求項 2】 コリネバクテリウム属 (Corynebacterium) の菌体由来である請求項 1 記載の酵素。

【請求項 3】 シュードモナス属 (Pseudomonas) の菌体由来である請求項 1 記載の酵素。

【請求項 4】 糖化タンパク質を酵素で分解した後、この分解物と糖化アミノ酸酸化還元酵素とを反応させ、この酸化還元反応を測定することにより、前記糖化タンパク質を測定する方法であって、前記酵素として請求項 1～3 のいずれか一項に記載の酵素を使用する測定方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規酵素に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

プロテアーゼは、様々な産業分野において利用されている。例えば、糖尿病の診断および治療等における重要な指標である、血清中の糖化アルブミン等の糖化タンパク質の測定方法にもプロテアーゼが使用されている。

【 0 0 0 3 】

このプロテアーゼを利用した糖化タンパク質の測定方法は、例えば、以下に示すようにして行うことができる。糖化タンパク質をプロテアーゼで分解し、この分解物と糖化アミノ酸酸化還元酵素とを反応させ、生成する過酸化水素量または消費される酸素量を測定することにより、前記糖化タンパク質の量を知ることができる。前記糖化アミノ酸酸化還元酵素としては、例えば、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ（以下、「FAOD」という）がある。前記プロテアーゼとして

は、特開平5-192193号公報、特開平7-289253号公報等に掲載されているものが使用されている。

【0004】

このように、糖化タンパク質を予めプロテアーゼで処理するのは、FAOD等は、糖化アミノ酸や糖化ペプチドに作用し、糖化タンパク質自身には作用し難いからである。特に、糖化ヘモグロビン（以下、「HbA1c」という）は、その糖化部分が $\beta$ 鎖N末端アミノ酸残基であるため、この部分にFAODが作用しやすいように、HbA1cを処理できるプロテアーゼが求められていた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

そこで、本発明の目的は、糖化タンパク質に対してFAODが作用しやすいように、前記糖化タンパク質を処理できる新規酵素の提供である。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、まず、FAODの作用機構を検討した。その結果、FAODは、糖化アミノ酸（ $\alpha$ -アミノ基に糖が結合したもの）には良く作用するが、糖化ペプチドにもは作用しがたいことがわかった。そこで、本発明者らは、この知見に基づいて、自然界の様々な菌を分離培養して、それが産生する酵素を検討した結果、糖化タンパク質または糖化ペプチドから、 $\alpha$ -アミノ基が糖化されたアミノ酸残基（ $\alpha$ -Glycated Amino acid、以下、「 $\alpha$ -GA」という）を遊離する新規酵素を産生する菌を分離することに成功し、本発明に至った。本発明の新規酵素（ $\alpha$ -Glycated Amino acid Releasing Enzyme、以下、「 $\alpha$ -GARE」という）により、FAODを用いたHbA1cの測定を臨床検査等で実用化することができる。また、HbA1cの測定の他に、他の糖化タンパク質の測定等の様々な分野で使用することもできる。なお、本発明の $\alpha$ -GAREは、 $\alpha$ -GAを遊離させる触媒機能のほかに、他の触媒機能、例えば、他のペプチド結合を切断する機能等を備えていても良い。本発明者らが分離した新菌体としては、コリネバクテリウム属（Corynebacterium）、シュードモナス（Pseudomonas）属等の菌体がある。なお、本発明の $\alpha$ -GAREは、これらの菌体由来に制限されな

い。

【0007】

本発明の $\alpha$ -GAREにおいて、遊離される糖化アミノ酸残基は、その $\alpha$ -アミノ基が糖化されていれば、特に制限されないが、前述のように、HbA1cは、N末端バリン残基が糖化されていることから、前記遊離される $\alpha$ -GAは、糖化バリン（以下、「 $\alpha$ -GV」という）であることが好ましい。

【0008】

本発明の $\alpha$ -GAREとしては、例えば、以下に示す、二種類の $\alpha$ -GAREがある。

【0009】

まず、一つめの $\alpha$ -GARE（以下、「 $\alpha$ -GARE-1」という）は、コリネバクテリウム属（Corynebacterium）の菌体由来であり、特に好ましくは、コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002（Corynebacterium ureolyticum KDK1002）由来である。このコリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002（Corynebacterium ureolyticum KDK1002）は、本発明者らが、土壤中より新規に単離した菌体であり、工業技術院生命工学工業技術研究所に、受託番号FERM P-17135（寄託日：平成11年1月6日）で、寄託されている。本菌体の菌学的特性は、下記に示すとおりである。

【0010】

（形態的特性）

本菌体の形状は、その大きさが $0.8 \times 1.2 \mu\text{m}$ の桿菌であり、非運動性である。

（培養的性質）

本菌体を常法の寒天培地に生育させた場合、そのコロニー形態は、低い凸状の円形であり、前記コロニーの色は、クリーム色である。

（生理学的性質）

グラム染色性	：	陽性
酸素要求性	：	通性嫌気性
硝酸塩還元	：	—

ピラジナミダーゼ	：	+
ピロリドニルアリルアミダーゼ	：	-
アルカリフォスファターゼ	：	-
$\beta$ -グルクロニダーゼ	：	-
$\beta$ -ガラクトシダーゼ	：	-
$\alpha$ -グルコシダーゼ	：	-
N-アセチル- $\beta$ -グルコサミナーゼ	：	-
エスクリン (グルコシダーゼ)	：	-
ウレアーゼ	：	+
ゼラチンの液化	：	-
$\beta$ -溶血性	：	-
炭水化物の発酵性		
ブドウ糖	：	-
リボース	：	-
キシロース	：	-
マンニトール	：	-
マルトース	：	-
乳糖	：	-
白糖	：	-
グリコーゲン	：	-

## 【 0 0 1 1 】

つぎに、二つ目の $\alpha$ -GARE (以下、「 $\alpha$ -GARE-2」という)は、シュードモナス属 (*Pseudomonas*) の菌体由来であり、特に好ましくは、シュードモナス アルカリゲネス KDK1001 (*Pseudomonas alcaligenes* KDK1001) 由来である。前記シュードモナス アルカリゲネス KDK1001 (*Pseudomonas alcaligenes* KDK1001) も、本発明者らが、土壤中より新規に単離した菌体であり、工業技術院生命工学工業技術研究所に、受託番号FERM P-17133 (寄託日：平成11年1月6日) で、寄託されている。本菌体の菌学的特性は、下記に示すとおりである。

## 【0012】

## (形態的特性)

本菌体の形状は、その大きさが $0.3 \times 1.0 \sim 1.5 \mu\text{m}$ の桿菌であり、極毛により運動性を有する。

## (培養的性質)

本菌体を常法の寒天培地に生育させた場合、そのコロニー形態は、低い凸状の円形であり、表面は滑らかである。前記コロニーの色は、半透明から淡黄色に変化する。マックコンケイ (Mac Conkey) 培地で生育は認められるが、良好とはいえない。また、培養温度 $40^\circ\text{C}$ では、生育しない。

## (生理学的性質)

グラム染色性	陰性
酸素要求性	好気性
硝酸塩還元	+
インドール産生	-
ブドウ糖酸性化	-
アルギニンジヒドロラーゼ	-
ウレアーゼ	-
エスクリン加水分解	+
ゼラチン加水分解	-
$\beta$ -ガラクトシダーゼ	+
ブドウ糖からのガスの生成	-

## 基質資化能

ブドウ糖	+
L-アラビノース	+
D-マンノース	+
D-マンニトール	+
N-アセチル-D-グルコサミン	-
マルトース	+
グルコン酸カリウム	+



n-カブリン酸 :	+
アジピン酸 :	-
DL-リンゴ酸 :	+
クエン酸ナトリウム :	-
酢酸フェニル :	-

## 【0013】

つぎに、本発明の糖化タンパク質の測定方法は、糖化タンパク質を酵素で分解した後、この分解物と糖化アミノ酸酸化還元酵素とを反応させ、この酸化還元反応を測定することにより、前記糖化タンパク質を測定する方法であって、前記酵素として本発明の酵素 ( $\alpha$ -GARE) を使用することを特徴とする。本発明の測定方法において使用する  $\alpha$ -GARE は、測定する糖化タンパク質の種類や、前記糖化タンパク質の濃度等により適宜決定されるが、一種類でもよいし、二種類以上を併用してもよい。また、前記  $\alpha$ -GARE が作用しやすいように、別の酵素 (例えば、プロテアーゼ等) で、予め糖化タンパク質等を分解させてもよい。なお、前記糖化アミノ酸酸化還元酵素としては、FAOD が好ましい。

## 【0014】

本発明の測定方法において、前記酸化還元反応の測定は、前記反応によって生じる過酸化水素量の測定または消費される酸素量の測定であることが好ましく、前記過酸化水素量を測定する場合、ペルオキシダーゼと酸化により発色する基質とを用いた測定であることが好ましい。なお、前記過酸化水素量は、前記ペルオキシダーゼ等を用いた酵素的手法の他に、例えば、電気的手法により測定することもできる。

## 【0015】

前記酸化により発色する基質 (以下、「発色性基質」という) としては、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス (ジメチルアミノ) ジフェニルアミンナトリウム (例えば、DA-64 : 和光純薬社製等)、オルトフェニレンジアミン (OPD)、トリンダー試薬とアミノアンチピリンとを組み合わせた基質等があげられ、特に好ましくは、DA-64 である

## 【0016】

## 【発明の実施の形態】

本発明の $\alpha$ -GAREを産生する菌体のスクリーニングは、例えば、以下に示すように、土壌中の菌体を分離培養し、その培養液を用いて、糖化ペプチドの分解反応を行い、得られる分解物を薄層クロマトグラフィー (TLC) により分析することによって行うことができる。なお、以下のスクリーニング方法は、 $\alpha$ -GARE産生菌を分離するために、本発明者らが詳細な検討を重ねた結果、見出したものである。このスクリーニング方法の確立によって、 $\alpha$ -GARE産生菌の分離が成功したといっても過言ではなく、換言すれば、これ以外のスクリーニング方法では、 $\alpha$ -GARE産生菌の分離は、極めて困難である。

## 【0017】

## (1) 培養方法

以下に示す栄養液体培地を、予め、オートクレーブにより、 $121^{\circ}\text{C}$ で20分間滅菌する。そして、土壌サンプルを滅菌水に懸濁し、これを前記滅菌済みの栄養液体培地に添加して、 $30^{\circ}\text{C}$ で、48時間振とう培養 (111 rpm) を行う。得られた培養液を、10,000 rpm、15 min、 $4^{\circ}\text{C}$ の条件で遠心分離して、その上清を回収する。

## 【0018】

## (栄養液体培地)

麦芽エキス (Malt extract: DIFCO 社製)	2.0 g
D-グルコース (ナカライテスク社製)	2.0 g
ペプトン (Bacto peptone: DIFCO社製)	0.1 g
蒸留水	100 ml

## 【0019】

## (2) 糖化ペプチドの分解反応

## (糖化ペプチドおよび糖化アミノ酸の製造方法)

そのアミノ酸配列が、HbA1c $\beta$ 鎖におけるN末端側アミノ酸配列と同様である $\alpha$ -アミノ基糖化ペプチドおよび $\alpha$ -GVを、以下のペプチドおよびバリンとグルコースとを用いて、常法により作製する。

## 【0020】

(ペプチド)

Val-His (ペプチド研究所社製：以下、この糖化物を「F2P」という)

Val-His-Leu (ペプチド研究所社製：以下、この糖化物を「F3P」という)

Val-His-Leu-Thr-Pro (SIGMA社製：以下、この糖化物を「F5P」という)

【0021】

(L-アミノ酸)

Val、LeuおよびHis (ペプチド研究所社製：以下、糖化バリンを「FV」という)

【0022】

(分解方法)

予め、前記各糖化ペプチドを、0.01Mの濃度になるように、蒸留水に溶解して、糖化ペプチド溶液をそれぞれ調製する。そして、前記各糖化ペプチド溶液50 $\mu$ lと、前記培養液上清100 $\mu$ lとをそれぞれ混合し、37℃で一晩反応させた後、これらの反応液を凍結乾燥する。

【0023】

(3) TLC分析

前記糖化ペプチドの分解物を、TLCにより分析し、 $\alpha$ -GARE活性の有無を確認する。なお、使用する試薬および方法を、以下に示す。

【0024】

(薄層プレート)

Pre-Coated TLC plate SILICA GEL 60 (メルク社製)

【0025】

(検出試薬)

ニンヒドリン (フナコシ社製) を0.5体積%の濃度になるように、75体積%エタノールで溶解する。

【0026】

(展開溶媒)

ブタノール（ナカライテスク社製）と酢酸（ナカライテスク社製）と蒸留水とを、2 : 1 : 1 の体積割合になるように混合する。

【0027】

(分析方法)

予め、展開距離が 8 cm になるように前記薄層プレートを準備し、前記プレート下端から 1 cm の位置を、サンプルスポットの原線とする。そして、TLC 分析の直前に、前記凍結乾燥した各反応液を、50 体積%エタノール 15  $\mu$ l にそれぞれ溶解して、これらをシリンジ（容量 25  $\mu$ l）により、前記原線上にスポットする。なお、コントロールとして、前記 FV および各種アミノ酸も、同様にスポットする。そして、予め、前記展開溶媒で飽和された展開槽に、このプレートをいれ、前記原線から約 8 cm の距離まで、前記展開溶媒を上昇させる。なお、前記展開溶媒は、前記プレートが、その下端から約 0.5 cm まで浸かるように入れておく。

【0028】

前記展開後、ドラフト内で完全に風乾させた前記プレートに、前記ニンヒドリン溶液を噴霧してから、予め熱しておいたホットスターラー（100℃）により加熱して、発色試験を行う。その結果、コントロールの FV と同じ移動度を示すサンプルが、 $\alpha$ -GARE 活性陽性であり、その培養液の菌体が、 $\alpha$ -GARE 産生菌体である。

【0029】

このようなスクリーニング方法により、発明者らが単離した新菌体としては、前記コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002 (*Corynebacterium ureolyticum* KDK1002) (FERM P-17135) およびシュードモナス アルカリゲネス KDK1001 (*Pseudomonas alcaligenes* KDK1001) (FERM P-17133) がある。

【0030】

つぎに、本発明の  $\alpha$ -GARE は、例えば、前述の培養方法に準じた方法により、本発明の  $\alpha$ -GARE を産生する菌体を培養することによって製造できる。コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002 (*Corynebacterium ureolyticu*

m KDK1002) (FERM P-17135) を使用する場合、その培養条件は、通常、培養温度 20～37℃の範囲、培養時間 18～72時間の範囲、培地の pH 7.0～8.0の範囲である。また、シュードモナス アルカリゲネス KDK1001 (Pseudomonas alcaligenes KDK1001) (FERM P-17133) を使用する場合、その条件は、通常、培養温度 20～37℃の範囲、培養時間 18～72時間の範囲、培地の pH 8.5～10.0の範囲である。

## 【0031】

前記培養液に含有される  $\alpha$ -GARE を、常法により分離精製することにより、 $\alpha$ -GARE の酵素標品を得ることができる。 $\alpha$ -GARE の精製は、通常、既知の方法である、硫酸などによる塩析法、等電点沈殿法、エタノール沈殿法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー等の組み合わせにより行うことができる。以下に、コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002 (Corynebacterium ureolyticum KDK1002) (FERM P-17135) 由来  $\alpha$ -GARE の精製方法の一例を示す。

## 【0032】

まず、前記培養液を遠心分離 (10,000 rpm、15 min、4℃) して、菌体を除去し、上清を得る。前記上清に 50 体積%になるように冷エタノールを添加し、充分に攪拌して、4℃で約 20 分間放置した後、この溶液を、10,000 rpm、15 min、4℃の条件で遠心分離する。得られた上清に、85 体積%になるように、再度、冷エタノールを添加し、攪拌した後、前述と同様に、放置、遠心分離を行い、沈殿を回収する。そして、この沈殿を、精製水に溶解する。

## 【0033】

この溶液をポロス HQ/M (ピーイーバイオシステムズ社製) カラムに供し、10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) により、非吸着画分を溶出し、回収する。そして、この非吸着画分を、バイオスケール (バイオラド社製) カラムに供し、1 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) により、非吸着画分を溶出し、回収することによって、部分精製された本発明の  $\alpha$ -GARE 酵素溶液を得るこ

とができる。

【0034】

つぎに、本発明の糖化タンパク質の測定方法について、血球を試料とし、前記血球中の糖化タンパク質（例えば、HbA1c）を、 $\alpha$ -GAREおよびFAODを用いて測定する例をあげて説明する。

【0035】

まず、全血から遠心分離等の常法により血球画分を分離し、これを溶血する。この溶血方法は、特に制限されず、例えば、界面活性剤を用いる方法、超音波による方法、浸透圧の差を利用する方法等が使用できる。この中でも、操作の簡便性等の理由から、界面活性剤を用いる方法が好ましい。

【0036】

前記界面活性剤としては、例えば、TritonX-100、Tween-20、Brij35等が使用できる。前記界面活性剤による処理条件は、通常、処理溶液中の血球濃度が、1～10体積%の場合、前記処理溶液中の濃度が0.1～1重量%になるように前記界面活性剤を添加し、室温で、5秒～1分程度攪拌すればよい。

【0037】

つぎに、前記溶血試料に対し、本発明の $\alpha$ -GAREによる酵素処理を行う。前記 $\alpha$ -GAREによる酵素処理は、通常、緩衝液中で行われ、その処理条件は、使用する $\alpha$ -GAREの種類（例えば、由来等の違い）や、糖化タンパク質の種類およびその濃度により適宜決定される。

【0038】

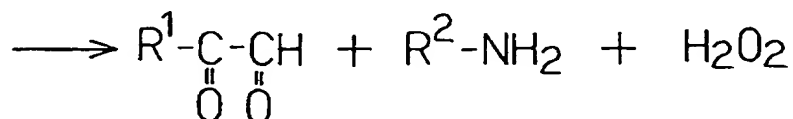
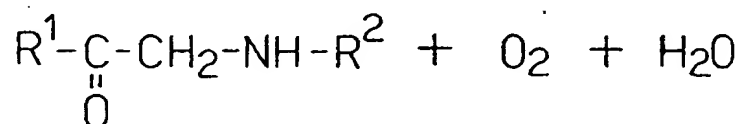
例えば、測定対象物がHbA1cであり、コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002(FERM P-17135) 由来の $\alpha$ -GAREを使用する場合、その処理条件は、通常、反応液中の $\alpha$ -GARE濃度0.1～10U/リットル、温度30～37℃、反応時間5～60分、pH6.0～9.0の範囲である。この場合、前記緩衝液としては、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、グッド緩衝液（EPSPS緩衝液、PIPES緩衝液等）等が使用できる。

【0039】

つぎに、前記 $\alpha$ -GAREによる酵素処理によって得られた分解物を、FAODで処理する。このFAOD処理により、下記式に示す反応が触媒される。下記式において、R1は、糖のアルドース残基を示し、R2はタンパク質、ペプチドまたはアミノ酸を示す。

【0040】

【化1】



【0041】

前記FAODは、前記反応を触媒するものであれば、特に制限されない。また、このFAOD処理は、前記 $\alpha$ -GAREによる酵素処理と同様に緩衝液中で行うことが好ましく、前記緩衝液としては、特に制限されず、例えば、トリス塩酸緩衝液、EPPS緩衝液、PIPES緩衝液等が使用できる。

【0042】

つぎに、前記FAOD処理で生じた過酸化水素を、前記PODおよび酸化により発色する基質を用いて、酸化還元反応を利用して測定する。

【0043】

前記酸化還元反応は、通常、緩衝液中で行われ、その条件は、過酸化水素濃度等により適宜決定される。通常、反応液中のPOD濃度1~10000IU/リットル、反応温度20~37℃、反応時間1~5分、pH5~9である。また、前記緩衝液は、特に制限されず、前記FAOD処理と同様の緩衝液等が使用できる。

【0044】

前記基質として前記発色性基質を用いた場合は、その発色（反応液の吸光度）を分光光度計で測定することにより、過酸化水素の濃度を測定でき、これから試料中の糖化タンパク質濃度を知ることができる。

## 【0045】

この測定において、各処理工程は、前述のように別々に行ってもよいが、場合によりいくつかの工程を同時に行ってもよいし、全てを同時に行ってもよい。例えば、試料に $\alpha$ -GAREとFAODとを同時に添加し、反応させることにより、 $\alpha$ -GAREによる酵素処理とFAOD処理とを同時に行うことができる。また、 $\alpha$ -GARE分解物に、FAODとPODと発色性基質とを同時に添加し、反応させることにより、FAOD処理と酸化還元処理とを同時に行うこともできる。この他に、前記界面活性剤による溶血処理と、 $\alpha$ -GAREによる酵素処理とを同時に行うことも可能である。

## 【0046】

## 【実施例】

## （実施例1）

この実施例は、本発明の $\alpha$ -GAREを産生する新菌体の培養液上清と、 $\alpha$ -GAを有する糖化ペプチドとを反応させて、前記糖化ペプチドから $\alpha$ -GAを遊離させた例である。なお、特に示さない限り、前記スクリーニング方法と同様にして、菌の培養、糖化ペプチドの分解およびTLC分析を行った。

## 【0047】

まず、コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002 (Corynebacterium ureolyticum KDK1002) (FERM P-17135) を、前記栄養培地 (pH 7.2) 200 ml に植菌して、30℃で48時間振とう培養を行った。得られた培養液を、遠心分離して、菌体を除去し、その上清を粗酵素液とした。

## 【0048】

前記粗酵素液100 $\mu$ lと前記各0.01M糖化ペプチド (F2P、F3P、F5P) 溶液50 $\mu$ lとをそれぞれ混合し、37℃で一晩、反応させた後、これらの反応液をTLCにより分析した。このTLC分析の結果を、図1および図2に示す。図1において、レーンNo. 1はコントロール (FV)、レーンNo.



2はコントロール (Leu、Val、His)、レーンNo. 3はF2P分解物、レーンNo. 4はF3P分解物であり、図2において、レーンNo. 1はF2P分解物、レーンNo. 2はF5P分解物である。また、同図中において矢印が示すスポットの移動度を、下記表1に示す。

【0049】

(実施例2)

シュードモナス アルカリゲネス KDK1001 (*Pseudomonas alcaligenes* KDK1001) (FERM P-17133) を前記栄養培地 (pH 9.0) に植菌し、前記実施例1と同様にして、菌の培養、糖化ペプチドの分解およびTLC分析を行った。このTLC分析の結果を図3に示す。同図中において、レーンNo. 1はコントロール (FV)、レーンNo. 2はコントロール (Leu、Val、His)、レーンNo. 3はF2P分解物、レーンNo. 4はF3P分解物である。また、同図中において矢印が示すスポットの移動度を、下記表1に併せて示す。

【0050】

【表1】

図No.	サンプル名	移動度
図1	コントロールFV	0.43
	F2P分解物	0.43
	F3P分解物	0.43
図2	F2P分解物	0.44
	F5P分解物	0.44
図3	コントロールFV	0.46
	F2P分解物	0.46
	F3P分解物	0.46

【0051】

図1、図2および図3ならびに前記表1に示すように、前記各粗酵素液により処理した糖化ペプチド分解物において、コントロールFVと同じ移動度でスポットが確認できた (矢印で示すスポット)。また、実施例2におけるF5P分解物も、FVと同じ移動度でスポットが確認できた (移動度0.46 : 図示せず)。

以上のことから、本発明の $\alpha$ -GAREにより、糖化ペプチドから $\alpha$ -GAが遊離することがわかった。さらに、前記分解物のスポットが、Valの移動度とは異なることから、 $\alpha$ -GAREにより遊離されたFVから糖（フルクトース）が乖離されていないこともわかった。また、図1、図2および図3に示すように、F2P分解物では、FVとHisのスポットが見られた。F3P分解物およびF5P分解物において、FV以外の分解物（ジペプチドおよびテトラペプチド）のスポットが見られないのは、このTLCの方法では検出されないためと推測できる。

## 【0052】

## （実施例3および比較例1）

この実施例は、実施例1および実施例2と同じ粗酵素液により糖化ペプチドを処理し、その処理物をFAOD等を用いた酸化還元反応を行うことにより、前記粗酵素液の $\alpha$ -GARE活性を測定した例である。使用した試薬、その組成および方法を以下に示す。

## 【0053】

## （50mM糖化ペプチド溶液）

前記F2Pを、50mMの濃度になるように蒸留水に溶解した。

## 【0054】

## （緩衝液A）

80mM トリス塩酸緩衝液（pH8.0）

## 【0055】

## （酸化還元反応液Bの組成）

DA64（和光純薬工業社製）	0.1mmol／リットル
POD（Type III：東洋紡績社製）	50KU／リットル
FAOD（キッコーマン社製）	10KU／リットル
緩衝液A	80mmol／リットル

## 【0056】

前記実施例1と同様にして調製した粗酵素液490 $\mu$ lと前記糖化ペプチド溶液10 $\mu$ lとを混合し、30℃で一晩反応させ、前記糖化ペプチドの分解を行っ

た。この分解液  $25 \mu\text{l}$  に前記緩衝液 A  $55 \mu\text{l}$  を添加した後、前記酸化還元反応液 B  $20 \mu\text{l}$  を混合して、反応を開始し、主波長  $694 \text{ nm}$ 、副波長  $884 \text{ nm}$  におけるこの反応液の吸光度を、生化学自動分析装置 JCA-BM8（日本電子社製）を用いて測定した。そして、予め、標準物質として FV を用いて FAOD による反応を行い作成した検量線と、前記吸光度とから、 $\alpha$ -GARE の活性を求めた。この結果を、下記表 2 に示す。なお、トリプシン（シグマ社製）、パパイン（シグマ社製）およびアミノペプチダーゼ（シグマ社製）を  $1 \text{ g}$  / リットルの濃度になるように精製水に溶解したものを、それぞれ酵素液として用いた以外は、前述と同様にして  $\alpha$ -GARE 活性の測定を行ったものを比較例とした。

【0057】

【表 2】

菌体名	$\alpha$ -GARE 活性 (U / リットル)
コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002	1.43
シュードモナス アルカリゲネス KDK1001	0.26

【0058】

表 2 に示すように、前記二種類の新菌体由来の粗酵素液を用いた場合、 $\alpha$ -GARE 活性が確認されたが、トリプシン、パパインおよびアミノペプチダーゼをそれぞれ用いた比較例では、 $\alpha$ -GARE 活性は検出できなかった。

【0059】

(実施例 4)

この実施例は、コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002 (*Corynebacterium ureolyticum* KDK1002) (FERM P-17135) 由来の  $\alpha$ -GARE 酵素溶液により糖化グロビンを処理し、その処理物を FAOD を用いた酸化還元反応を行うことにより、 $\alpha$ -GARE 活性を測定した例である。使用した試薬、その組成および方法を以下に示す。

【0060】

(  $\alpha$ -GARE 酵素溶液の調製方法 )コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002 (*Corynebacterium ureolyti*

cum KDK1002) (FERM P-17135) を、前記栄養培地 (pH 7.2) 200 ml に植菌して、30℃で48時間振とう培養を行い、得られた培養液から遠心分離により菌体を除去し、その上清を回収した。そして、この上清を、前述と同様に、ポロスHQ/M (ピーイーバイオシステムズ社製) カラムおよびバイオスケール (バイオラド社製) カラムに供し、 $\alpha$ -GARE の部分精製を行い、得られた活性画分を  $\alpha$ -GARE 酵素溶液とした。

## 【0061】

## (糖化グロビンの調製方法)

ヒト血球より、テールの方法 (Teale, F.W.J., Biochem. Biophys. Acta, 35, 543, 1959) に従い、グロビンを精製した。そして、このグロビンに対し、グルコースを10重量%の濃度になるように添加し、40℃で一週間放置することにより糖化グロビンを調製した。

## 【0062】

予め、前記糖化グロビンを、蒸留水に2 g/リットルの濃度になるように溶解して、糖化グロビン溶液を調製した。そして、前記  $\alpha$ -GARE 酵素溶液 100  $\mu$ l、前記糖化グロビン 50  $\mu$ l および 100 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 350  $\mu$ l を混合し、37℃で3時間反応させて、糖化グロビンの分解を行った。この分解液を用いて、前記実施例3と同様にして  $\alpha$ -GARE の活性を求めた。なお、前記 FAOD (キッコーマン社製) は、 $\alpha$ -GA に特異的に作用するため、前記コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002 (Corynebacterium ureolyticum KDK1002) (FERM P-17135) 由来の  $\alpha$ -GARE が、 $\alpha$ -GA 以外に、例えば、 $\epsilon$ -アミノ基が糖化されたアミノ酸残基等を遊離させていても、 $\alpha$ -GARE 活性のみを測定することができる。その結果、 $\alpha$ -GARE 活性は2.1 U/リットルであった。

## 【0063】

このように、本発明の  $\alpha$ -GARE によれば、 $\alpha$ -GA が遊離し、FAOD が作用しやすくなるため、糖化タンパク質や糖化ペプチドの測定を精度良く行うことができる。

## 【0064】

## 【発明の効果】

このように本発明の新規酵素である $\alpha$ -GAREは、糖化タンパク質等から、 $\alpha$ -アミノ基が糖化されたアミノ酸残基を遊離させることができる。したがって、例えば、前記 $\alpha$ -GAREを、FAODを用いた糖化タンパク質の測定方法に使用すれば、糖尿病診断の指標となるHbA1cの測定を正確かつ簡便に行うことができるため、HbA1cの測定を臨床検査等において実用化することが可能となる。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の一実施例において、コリネバクテリウム属の菌体の培養液上清を用いて、糖化ペプチドを分解し、その分解物をTLCにより分析したクロマトグラムである。

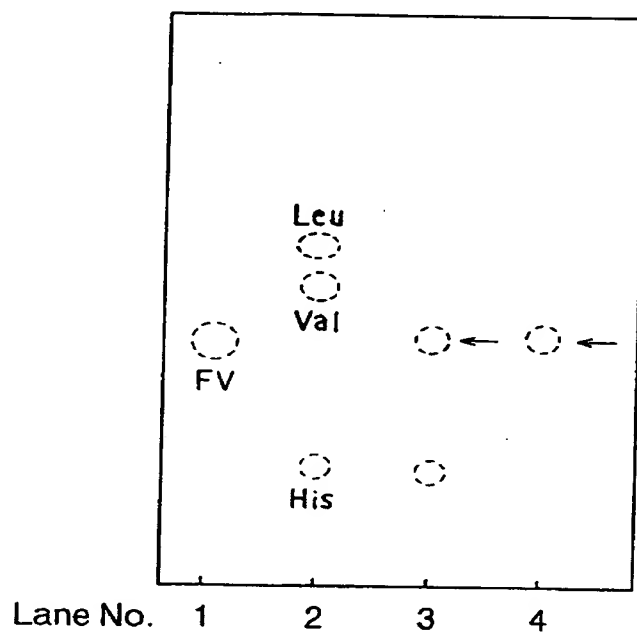
【図2】 前記一実施例において、コリネバクテリウム属の菌体の培養液上清を用いて、糖化ペプチドを分解し、その分解物をTLCにより分析したその他のクロマトグラムである。

【図3】 本発明のその他の前記一実施例において、シュードモナス属の菌体の培養液上清を用いて、糖化ペプチドを分解し、その分解物をTLCにより分析したクロマトグラムである。

【書類名】

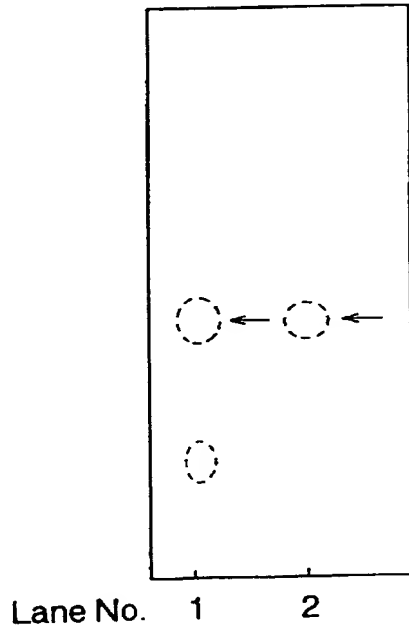
図面

【図 1】



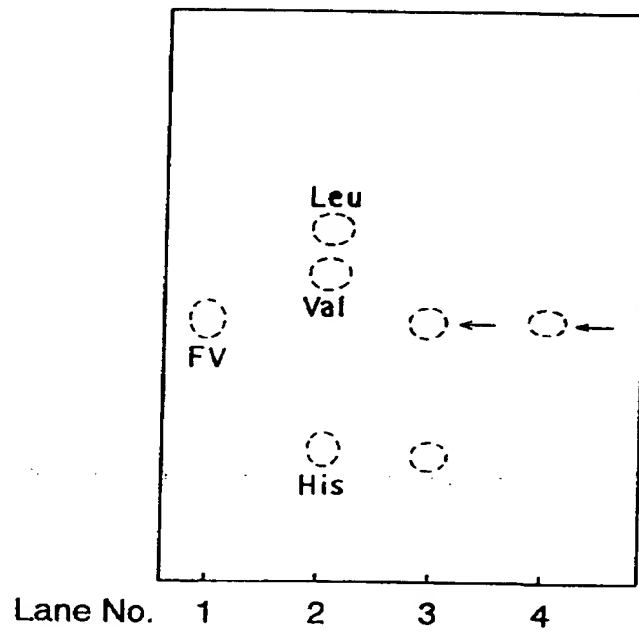
- Lane No. 1    コントロール FV
- Lane No. 2    コントロール Leu,Val,His
- Lane No. 3    F2P 分解物
- Lane No. 4    F3P 分解物

【図 2】



Lane No. 1 F2P 分解物  
Lane No. 2 F5P 分解物

【図 3】



- Lane No. 1    コントロール FV  
 Lane No. 2    コントロール Leu,Val,His  
 Lane No. 3    F2P 分解物  
 Lane No. 4    F3P 分解物



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】糖化タンパク質等から、 $\alpha$ -アミノ基が糖化されたアミノ酸残基 ( $\alpha$ -GA) を遊離する新規酵素 ( $\alpha$ -GARE) を提供する。

【解決手段】スクリーニングにより、 $\alpha$ -GARE を産生する新菌体を単離する。まず、土壌サンプルを液体培地に添加し、振とう培養を行い、その培養液上清により、 $\alpha$ -GA を有する糖化ペプチドの分解反応を行う。そして、前記分解物を TLC により分析し、その結果、 $\alpha$ -GA と同じ移動度のスポットが得られたサンプルが、 $\alpha$ -GARE 活性陽性であり、その培養液の菌体が  $\alpha$ -GARE 産生菌である。前記産生菌としては、コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002 (FERM P-17135) およびシュードモナスアルカリゲネス KDK1001 (FERM P-17133) がある。これらの菌体の培養液上清を用いれば、図 1 のように、糖化ペプチドから  $\alpha$ -GA を遊離できる。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000141897]

1. 変更年月日

1990年 8月11日

[変更理由]

新規登録

住 所

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

氏 名

株式会社京都第一科学